



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 43 41 524 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 43 41 524.5
㉑ Anmeldetag: 6. 12. 93
㉒ Offenlegungstag: 8. 6. 95

㉓ Int. Cl.⁶:
C 12 N 11/06
C 12 N 11/08
C 12 N 11/12
C 12 N 11/14
C 07 K 17/06
C 07 K 17/08
C 07 K 17/12
C 07 K 17/14
C 08 B 37/16

DE 43 41 524 A 1

㉔ Anmelder:
Glüsenkamp, Karl-Heinz, Dr., 45239 Essen, DE;
Eberle-Adamkiewicz, Gertrud, Dr., 35094 Lahntal, DE

㉕ Vertreter:
Gehrke, P., Dipl.-Biol.Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 45894
Gelsenkirchen

㉖ Erfinder: .
gleich Anmelder

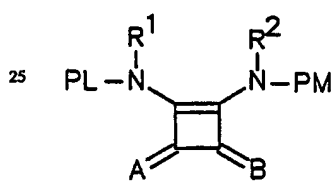
㉗ Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen und Affinitätsliganden an polymere Träger

㉘ Die Erfindung betrifft immobilisierte Biomoleküle, wobei Immobilisierungsmittel Quadratsäure-Derivate sind, die kovalent Biomoleküle mit einer polymeren Matrix verbinden, und Verfahren zur Herstellung von aktivierten Matrices, wobei polymere Matrices, die primäre oder sekundäre Aminogruppen enthalten, mit Quadratsäurediester, Quadratsäurehalogeniden oder Quadratsäureesterhalogeniden als Aktivierungsmittel unter Ausbildung aktiver Gruppen zu aktivierten Matrices umgesetzt werden.

DE 43 41 524 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen wie z. B. Enzymen, monoklonalen und polyklonalen Antikörpern, Zellen, Zellorganellen und Gewebeschnitten sowie Affinitätsliganden an eine Vielzahl von verschiedenen polymeren Trägern. Die chemischen Bindungen zwischen den Trägern und den Liganden sind amidähnliche Bindungen mit einer überraschend hohen Stabilität. Eine Voraussetzung für diese Verknüpfung ist, daß sowohl der polymere Träger als auch der Ligand primäre oder sekundäre aliphatische Aminogruppen bzw. aromatische Aminogruppen enthält. Ein weiterer, neben der hohen Stabilität der Bindung hervorzuhebender Vorteil gegenüber gängigen Immobilisierungsmethoden ist die sehr schonende Kopplungschemie, die es überraschenderweise erlaubt, gezielt z. B. nur periphere Aminogruppen von Proteinen für die Verknüpfung einzusetzen. Im Vergleich zu bisher bekannten Techniken führt die erfindungsgemäß angewandte neue Immobilisierung auch z. B. zu einer wesentlichen Stabilisierung vieler immobilisierter Makromoleküle wie Immunglobuline oder Enzyme, so daß diese vor Denaturierung zum Teil geschützt sind. Die chemischen "Linker", die zwei Aminogruppen miteinander verbinden, sind Derivate der Quadratsäure (Formel (I)). Es ist bekannt (A.H. Schmidt, Synthesis, 1980, 961, K.-H. Glüsenkamp et al, Z. Naturforsch. C 1991, 46, 498, L.F. Tietze et al, Chem. Ber. 1991, 124, 1215.), daß z. B. Quadratsäurediethylester in einer Zweistufenreaktion mit Aminen zu Diamiden umgesetzt werden kann. Völlig neu ist aber der Einsatz dieses Reagenz zur Immobilisierung von aminogruppen-tragenden Molekülen an polymere, Matrices, die ebenfalls mit Aminogruppen versehen sein müssen, wobei die Reste der allgemeinen Formel (I) R^1 , R^2 , A, B, PL und PM die in der Beschreibung angegebene Bedeutung haben.



(I)

Die Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel (I)

wo R^1 und R^2 gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff, Cycloalkyl mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen oder für geradkettiges oder verzweigtes Alkyl mit bis zu 8 Kohlenstoffatomen stehen, das gegebenenfalls durch Halogen, oder geradkettiges oder verzweigtes Alkoxy mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen oder Hydroxy substituiert ist, für Phenyl oder Benzyl steht, das gegebenenfalls durch Halogen, Nitro, Cyano, Carboxy, geradkettiges oder verzweigtes Alkyl, Alkoxy, Acyl oder Alkoxy-carbonyl mit jeweils bis zu 6 Kohlenstoffatomen oder durch eine Gruppe der Formel $-NR^3R^4$ substituiert ist, worin R^3 und R^4 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder geradkettiges oder verzweigtes Alkyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen bedeuten, A für Sauerstoff oder für Schwefel steht, B für Sauerstoff oder für Schwefel steht, PL in Abhängigkeit von der jeweiligen Bedeutung von PM für ein Enzym steht, wie z. B. alkalische Phosphatase, β -Galactosidase, T4 PN Kinase, Horseradish Peroxidase, Phospholipase C oder z. B. Proteinasen wie Papain, Pepsin, Proteinase K, Carboxypeptidase, Endoproteinase Arg-C, Bromelain, Collagenase, Dipeptidyl Peptidase IV, oder Nucleasen wie z. B. RNase A, RNase T1, RNase T2, DNase I, Bal 31, oder Oxidasen wie z. B. Alkohol Oxidase, Glucose Oxidase, oder Esterasen wie z. B. Phosphodiesterase I und II, oder Glucosidasen wie z. B. β -Glucuronidase, Heparinase I, oder Lektine wie z. B. Concanavalin A oder für Protein A oder Protein G steht oder für Immunglobuline vom Typ IgM, IgG, IgE, IgA und deren Fragmente steht oder für andere mit Aminogruppen funktionalisierte Verbindungen wie z. B. verschiedene Aminocyclodextrine steht, PM für eine mit kovalent gebundenen primären oder sekundären Aminogruppen tragende beliebige natürliche oder synthetische wasserlösliche oder wasserunlösliche Matrix in verschiedenen Ausführungsformen (Teströhrchen, Microtiterplatten, Objektträger, Beads), die z. B. aus Cellulose, Polystyrol, Polypropylen, Polycarbonat oder Glas bestehen kann, oder auch für verschiedene Zellen, Zellorganellen und Gewebeschnitte stehen kann.

Die Erfindung betrifft bevorzugt Verbindungen der allgemeinen Formel (I)

wo

R¹ und R² gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff, Cycloalkyl mit 3 bis 4 Kohlenstoffatomen oder für geradkettiges oder verzweigtes Alkyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen stehen, das gegebenenfalls durch Halogen, oder geradkettiges oder verzweigtes Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen oder Hydroxy substituiert ist, 5
für Phenyl oder Benzyl steht, das gegebenenfalls durch Halogen, Nitro, Cyano, Carboxy, geradkettiges oder verzweigtes Alkyl, Alkoxy, Acyl oder Alkoxy-carbonyl mit jeweils bis zu 4 Kohlenstoffatomen oder durch eine Gruppe der Formel —NR³R⁴ substituiert ist,

worin

R³ und R⁴ gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder geradkettiges oder verzweigtes Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen bedeuten, 10

A für Sauerstoff oder für Schwefel steht,

B für Sauerstoff oder für Schwefel steht,

PL

in Abhängigkeit von der jeweiligen Bedeutung von PM 15

für ein

Enzym steht, wie z. B. alkalische Phosphatase, β -Galactosidase, T4 PN Kinase, Horseradish Peroxidase, Phospholipase C oder z. B. Proteinase wie Papain, Pepsin, Proteinase K, Carboxypeptidase, Endoproteinase Arg—C, Bromelain, Collagenase, Dipeptidyl Peptidase IV, oder Nucleasen wie z. B. RNase A, RNase T1, RNase T2, DNase I, Bal 31, oder Oxidasen wie z. B. Alkohol Oxidase, Glucose Oxidase, oder Esterasen wie z. B. Phosphodiesterase I und II, oder Glucosidasen wie z. B. β -Glucuronidase, Heparinase I, oder Lektine wie z. B. Concanavalin A 20

oder

für Protein A

oder für Protein G steht, 25

oder für Immunglobuline vom Typ IgM, IgG, IgE, IgA und deren Fragmente steht,

oder für andere mit Aminogruppen funktionalisierten Verbindungen wie z.B. verschiedene Aminocyclodextrine, PM 25

für eine mit kovalent gebundenen primären oder sekundären Aminogruppen tragende beliebige natürliche oder synthetische wasserlösliche oder wasserunlösliche Matrix in verschiedenen Ausführungsformen (Teströhrchen, Microtiterplatten, Objektträger, Beads), die z. B. aus Cellulose, Polystyrol, Polypropylen, Polycarbonat oder Glas bestehen kann, 30

oder auch für verschiedene Zellen, Zellorganellen und Gewebeschnitte stehen kann.

Die Erfindung betrifft besonders bevorzugt Verbindungen der allgemeinen Formel (I)

wo 35

R¹ und R² gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff, für geradkettiges oder verzweigtes Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen stehen, das gegebenenfalls durch Halogen, oder geradkettiges oder verzweigtes Alkoxy mit bis zu 3 Kohlenstoffatomen oder Hydroxy substituiert ist,

für Benzyl steht, das gegebenenfalls durch Halogen, Nitro, Cyano, Carboxy, geradkettiges oder verzweigtes Alkyl, Alkoxy, Acyl oder Alkoxy-carbonyl mit jeweils bis zu 4 Kohlenstoffatomen oder durch eine Gruppe der Formel —NR³R⁴ substituiert ist, 40

worin

R³ und R⁴ gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder geradkettiges oder verzweigtes Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen bedeuten, 45

A, B für Sauerstoff steht

PL

in Abhängigkeit von der jeweiligen Bedeutung von PM

für ein

Enzym steht, wie z. B. alkalische Phosphatase, β -Galactosidase, T4 PN Kinase, Horseradish Peroxidase, Phospholipase C oder z. B. Proteinase wie Papain, Pepsin, Proteinase K, Carboxypeptidase, Endoproteinase Arg—C, Bromelain, Collagenase, Dipeptidyl Peptidase IV, oder Nucleasen wie z. B. RNase A, RNase T1, RNase T2, DNase I, Bal 31, oder Oxidasen wie z. B. Alkohol Oxidase, Glucose Oxidase, oder Esterasen wie z. B. Phosphodiesterase I und II, oder Glucosidasen wie z. B. β -Glucuronidase, Heparinase I, oder Lektine wie z. B. Concanavalin A 50

oder

für Protein A, 55

oder für Protein G steht,

oder für Immunglobuline vom Typ IgM, IgG, IgE, IgA und deren Fragmente steht,

für eine mit kovalent gebundenen primären oder sekundären Aminogruppen tragende beliebige natürliche oder synthetische wasserlösliche oder wasserunlösliche Matrix in verschiedenen Ausführungsformen (Teströhrchen, Microtiterplatten, Objektträger, Beads), die z. B. aus Cellulose, Polystyrol, Polypropylen, Polycarbonat oder Glas bestehen kann, 60

oder auch für verschiedene Zellen, Zellorganellen und Gewebeschnitte stehen kann.

Es zeigt Abb. 1 die Immobilisierung von Biomolekülen.

Das erfindungsgemäße Verfahren soll durch folgendes Formelschema (Abb. 1) beispielhaft, ohne daß dadurch eine Beschränkung ihres Umfanges erfolgen soll, erläutert werden. Das Verfahren zur Immobilisierung erfolgt insgesamt in drei Schritten: 65

I. Aktivierung

Eine aminogruppen-tragende Matrix — $\text{PM}-\text{NH}_2$ — wird in einem inerten Lösungsmittel mit einem beliebigen Quadratsäuredialkoxylester (wie z. B. Dimethylester, Diethylester oder auch Dibutylester) oder auch mit Quadratsäurehalogeniden gegebenenfalls in Gegenwart einer organischen Base zu einer aktivierten Matrix umgesetzt (Abb. 1).

Der Quadratsäuredialkoxylester oder das Quadratsäurehalogenid kann je nach gewünschtem Aktivierungsgrad im molaren Unterschub bis zu einem großen Überschub zu den zu aktivierenden Aminogruppen der Matrix zugesetzt werden (z. B. 0.1 bis 100). Im letzteren Falle erreicht man eine vollständige Umsetzung. Als besonders vorteilhaft erweist sich nun bei dieser Aktivierungsmethode, daß eine vollständige Rückgewinnung des nicht reagierten Quadratsäurederivates leicht möglich ist.

Als inerte Lösemittel eignen sich hierbei die üblichen organischen Lösemittel, die sich unter den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen nicht verändern. In Abhängigkeit von dem eingesetzten Quadratsäurederivat gehören hierzu bevorzugt Alkohole wie Ethanol, Methanol, Propanol, Butanol, oder Ether wie Diethylether, Butylmethylether, Dioxan oder Tetrahydrofuran, oder Kohlenwasserstoffe wie Benzol, Toluol, Xylol oder Hexan, oder Amide wie Dimethylformamid, oder Hexamethylphosphorsäuretriamid, oder Nitrile wie Acetonitril, oder Ketone wie Aceton oder halogenierte Kohlenwasserstoffe, wie Chloroform oder Dichlormethan. Ebenso ist es möglich, Gemische der genannten Lösemittel einzusetzen. Besonders bevorzugt sind Ethanol oder Diethylether.

Als Basen werden im allgemeinen organische Basen wie z. B. Triethylamin, Tripropylamin, Pyridin, Piperidin, N,N-Dimethylaminopyridin, N-Methylimidazol oder Picolin verwendet. Bevorzugt ist Triethylamin.

Die Base wird im allgemeinen in einer Menge von 1 mol bis 100 mol, bevorzugt von 1 mol bis 10 mol bezogen auf 1 mol der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) eingesetzt.

Die Umsetzung erfolgt in einem Temperaturbereich von 0°C bis $+100^\circ\text{C}$, bevorzugt von $+4^\circ\text{C}$ bis $+60^\circ\text{C}$.

Die Umsetzung wird im allgemeinen bei Normaldruck durchgeführt. Es ist ebenso möglich, die Umsetzung bei erhöhtem oder erniedrigtem Druck durchzuführen (z. B. von 0.5 bis 5 bar).

Die Reaktionszeit schwankt in Abhängigkeit von den ausgewählten Reaktionskomponenten und der Reaktionstemperatur.

II. Immobilisierung

Die so mit Quadratsäureresten aktivierte Matrix wird anschließend im wäßrigen Puffersystem, das gegebenenfalls auch mit organischen Lösungsmitteln versetzt werden kann, mit aminogruppen-tragenden, z. B. polymeren Verbindungen zu stabilen Konjugaten gekoppelt, wobei sich eine oder mehrere stabile kovalente Bindungen ausbilden können.

Als Reaktionsmedium eignen sich alle wäßrigen Puffersysteme, sofern sie frei von primären und sekundären Aminen sind, wie z. B. Phosphat, Citrat, Borat, Carbonat, Tris oder auch Gemische. Die Konzentration kann in weiten Bereichen variieren, wie z. B. von 0.01 bis 5 molar, bevorzugt ist 0.1 molar.

Die Konzentrationen der zu konjugierenden Moleküle kann in weiten Bereichen variieren und liegt z. B. für die zu koppelnden Proteine zwischen 0.01 und 50 mg/ml. Die Umsetzung erfolgt in einem Temperaturbereich von $+4^\circ\text{C}$ bis $+60^\circ\text{C}$, bevorzugt von $+4^\circ\text{C}$ bis $+40^\circ\text{C}$.

Die Umsetzung wird im allgemeinen bei Normaldruck durchgeführt. Es ist ebenso möglich, die Umsetzung bei erhöhtem oder erniedrigtem Druck durchzuführen (z. B. von 0.5 bis 5 bar).

Der pH-Wert der Kopplungsreaktion kann zwischen pH 7-10 liegen, bevorzugt ist pH 9.

Die Reaktionszeit schwankt in Abhängigkeit von den ausgewählten Reaktionskomponenten, der Reaktionstemperatur und dem pH-Wert und liegt normalerweise bei 0.1-50 h.

III. Abblocken der restlichen reaktiven Gruppen der aktivierten polymeren Träger

Als besonders vorteilhaft gegenüber anderen Immobilisierungsmethoden erweist sich nun das erfindungsge-
mäß schonende Verfahren, da es möglich ist, die restlichen, nicht reagierten aktiven Gruppen gezielt zu desakti-
vieren. Zum Abblocken der restlichen aktiven Gruppen eignen sich niedermolekulare Verbindungen mit aktiven
Aminogruppen wie z. B. monomere oder oligomere Aminosäuren, Aminoalkohole wie z. B. Ethanolamin oder
Diethanolamin, Aminoether wie z. B. Polyethylenglycolamin, oder Aminosucker wie z. B. Glucosamin. Auf diese
Weise ist es möglich, positive, negative, hydrophile, hydrophobe oder amphipatische Gruppen unterschiedli-
cher Größe gezielt zusätzlich an die polymere Matrix kovalent zu binden. Es ist so möglich, die biochemischen,
immunchemischen oder enzymatischen Reaktionen oder Aktivitäten zu modulieren bzw. zu stabilisieren.

Als Abblockmedium eignen sich alle wässrigen Puffersysteme, sofern sie frei von primären und sekundären Aminen sind, wie z. B. Phosphat, Citrat, Borat, Carbonat, Tris oder auch Gemische der genannten Systeme. Die
Konzentration kann in weiten Bereichen variieren, wie z. B. von 0.01 bis 5 molar, bevorzugt ist 0.1 molar.

Die Konzentration der zu konjugierenden Gruppen kann in weiten Bereichen variieren und liegt z. B. für
Aminosäuren zwischen 0.01 und 100 mg/ml.

Die Umsetzung erfolgt in einem Temperaturbereich von $+4^\circ\text{C}$ bis $+60^\circ\text{C}$, bevorzugt von $+4^\circ\text{C}$ bis $+40^\circ\text{C}$.

Die Umsetzung wird im allgemeinen bei Normaldruck durchgeführt. Es ist ebenso möglich, die Umsetzung bei
erhöhtem oder erniedrigtem Druck durchzuführen (z. B. von 0.5 bis 5 bar).

Der pH-Wert der Abblockreaktion kann zwischen pH 7-10 liegen, bevorzugt ist pH 9.

Die Reaktionszeit schwankt in Abhängigkeit von den ausgewählten Reaktionskomponenten, der Reaktions-
temperatur und dem pH-Wert und liegt normalerweise bei 0.1-50 h.

Die sehr selektive Kopplungschemie macht es auch überraschenderweise möglich, nach Aktivierung der Matrix mit Quadratsäuregruppen beliebige Polyamine mit der aktivierten Matrix reagieren zu lassen. Die so gezielt eingeführten weiteren Aminogruppen können dann anschließend mit Quadratsäuregruppen wiederum aktiviert werden. Auf diese Weise ist es möglich, extrem chemisch aktive Oberflächen zu generieren, die z. B. in der Lage sind, sehr große Moleküle oder auch Zellen durch viele kovalente Bindungen zu stabilisieren. Diese Vorgehensweise wird beispielhaft, ohne daß dadurch eine Beschränkung ihres Umfanges erfolgen soll, in Beispiel 1 beschrieben.

Beispiele:

1. Immobilisierung von Zellen und Gewebeschnitten auf Objektträgern

a) Aktivierung der Objektträger

Nach Standardmethoden aminopropylierte Objektträger werden in 10%ige Quadratsäurediethylester (Fa. Aldrich)/Ethanol Lösung (1% Triethylamin) gegeben und bei Raumtemperatur 10 h inkubiert. Danach wird intensiv mit Ethanol gewaschen, zum Schluß mit Phosphatpuffer pH 6.0 erneut gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die so aktivierten Glasoberflächen können unbegrenzt bei +4°C und in einer ges. Ethanolatmosphäre aufbewahrt werden.

b) Immobilisierung von Poly-D-Lysin

In eine Lösung von Poly-D-Lysin (Sigma, Mol.Wt. 1000-4000, 5 mg/ml), in 150 mM Borat (pH 9.0) werden die zuvor aktivierten Objektträger für 24 h inkubiert. Danach wird sehr intensiv mit Borat pH 9, Phosphat pH 7 und anschließend mit steigenden Mengen Ethanol bis 100% gespült und luftgetrocknet.

c) 2. Aktivierung mit Quadratsäurediester (Aktivierung der Aminogruppen des Lysins)

Die zuvor mit Poly-D-Lysin behandelten Objektträger werden in 10 %ige Quadratsäurediethylester/Ethanol Lösung (1% Triethylamin) gegeben und erneut bei Raumtemperatur 10 h inkubiert. Danach wird intensiv mit Ethanol gewaschen, zum Schluß mit Phosphatpuffer pH 6.0 erneut gewaschen und anschließend luftgetrocknet.

d) Fixierung von Zellen auf aktivierte Objektträger

Serumfreie Zellen (z. B. Maus-Myelomzellen) werden in möglichst wenig isotonischem Puffer (Borat, pH 8.0) auf die Objektträger aufgegeben (Abstrich), evtl. leicht zentrifugiert und anschließend für eine Stunde bei +37°C inkubiert. Danach werden die Objektträger für eine weitere Stunde mit 200 mM Lysin (pH 8-8.5) behandelt und danach mit PBS (pH 7.4) intensiv gespült. Die so immobilisierten Zellen bilden eine lückenlose, sehr stabile Zellschicht auf dem Objektträger.

2. Immobilisierung von Protein A auf AF-Amino TOYOPEARL 650 N (Fa. TOSOHAAS)

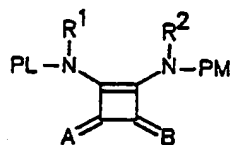
a) Aktivierung des Gels mit Quadratsäurediester

25 g Af-Amino-650 M (Partikel-Größe: 65 µ, 100 µmol/ml Amin) wird mit dest. Wasser intensiv gewaschen und anschließend mit Ethanol (abs.) behandelt. 2 g (0.018 mol) Quadratsäurediethylester (Fa. Aldrich) wird in 4 ml Ethanol (abs.) gelöst, zu 25 g vorbehandeltem Af-Amino-650 M gegeben und mit 1.000 g (0.068 mol) Triethylamin versetzt. Nach 10 h wird abfiltriert und mit Ethanol intensiv gewaschen. 1 g des aktivierten, farblosen Gels wird mit 16 mg Protein A (Fa. Sigma) in 1.5 ml Boratpuffer (pH 9.2) bei Raumtemperatur für 12 h inkubiert. Mit Hilfe der UV-Spektroskopie und der Gelfiltration wird die Kinetik der Immobilisierungsreaktion bestimmt. Nach 12 h ist kein Protein mehr im Überstand nachweisbar. Danach wird das Gel mit Boratpuffer (pH 9.2) gewaschen und mit 200 mM Ethanolamin (pH 9.2) für 5 h inkubiert, um die restlichen reaktiven Gruppen abzublocken. Anschließend wird das Gel erneut mit Puffer (PBS, pH 7.4) gewaschen und kann danach zum Aufreinigen von Antikörpern verwendet werden (Bindungskapazität: etwa 30 mg IgG/ml Gel).

Patentansprüche

1. Immobilisierte Biomoleküle dadurch gekennzeichnet, daß die Immobilisierungsmittel Quadratsäure-Derivate sind, die kovalent Biomoleküle mit einer polymeren Matrix verbinden.

2. Immobilisierte Biomoleküle dadurch gekennzeichnet, daß das Immobilisierungsmittel ein Quadratsäure-Derivat (I) ist, das eine allgemeine chemische Strukturformel wie folgt besitzt:



(I)

wo

- R¹ und R² gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff, Cycloalkyl mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen oder für geradkettiges oder verzweigtes Alkyl mit bis zu 8 Kohlenstoffatomen stehen, das gegebenenfalls durch Halogen, oder geradkettiges oder verzweigtes Alkoxy mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen oder Hydroxy substituiert ist,
- 5 für Phenyl oder Benzyl steht, das gegebenenfalls durch Halogen, Nitro, Cyano, Carboxy, geradkettiges oder verzweigtes Alkyl, Alkoxy, Acyl oder Alkoxycarbonyl mit jeweils bis zu 6 Kohlenstoffatomen oder durch eine Gruppe der Formel —NR³R⁴ substituiert ist, worin
- 10 R³ und R⁴ gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder geradkettiges oder verzweigtes Alkyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen bedeuten, A für Sauerstoff oder für Schwefel steht, B für Sauerstoff oder für Schwefel steht, PL
- 15 in Abhängigkeit von der jeweiligen Bedeutung von PM für ein Enzym steht, wie z. B. alkalische Phosphatase, β -Galactosidase, T4 PN Kinase, Horseradish Peroxidase, Phospholipase C oder z. B. Proteinasen wie Papain, Pepsin, Proteinase K, Carboxypeptidase, Endoproteina- se Arg—C, Bromelain, Collagenase, Dipeptidyl Peptidase IV, oder Nucleasen wie z. B. RNase A, RNase T1, RNase T2, DNase I, Bal 31, oder Oxidasen wie z. B. Alkohol Oxidase, Glucose Oxidase, oder Esterasen wie
- 20 z. B. Phosphodiesterase I und II, oder Glucosidasen wie z. B. β -Glucuronidase, Heparinase I, oder Lektine wie z. B. Concanavalin A oder
- für Protein A oder Protein G steht
- 25 oder für Immunglobuline vom Typ IgM, IgG, IgE, IgA und deren Fragmente steht oder für andere mit Aminogruppen funktionalisierte Verbindungen wie z. B. verschiedene Aminocyclodex- trine steht, PM
- 30 für eine mit kovalent gebundenen primären oder sekundären Aminogruppen tragende beliebige natürliche oder synthetische wasserlösliche oder wasserunlösliche Matrix in verschiedenen Ausführungsformen (Test- röhren, Microtiterplatten, Objektträger, Beads), die z. B. aus Cellulose, Polystyrol, Polypropylen, Polycar- bonat oder Glas bestehen kann, oder auch für verschiedene Zellen, Zellorganellen und Gewebeschnitten stehen kann.
- 35 3. Verfahren zur Herstellung von aktivierten Matrices dadurch gekennzeichnet, daß man polymere Matri- ces, die primäre oder sekundäre Aminogruppen enthalten, mit Quadratsäurediester, Quadratsäurehalogeni- den oder Quadratsäureesterhalogeniden als Aktivierungsmittel unter Ausbildung aktiver Gruppen zu aktivierten Matrices umsetzt.
4. Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Biomolekülen nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, daß man Biomoleküle, die mindestens eine primäre oder sekundäre Aminogruppe enthalten müssen, mit
- 40 einer beliebigen aktivierten Matrix unter Ausbildung einer kovalenten Verknüpfung oder mehrerer stabiler kovalenter Verknüpfungen umsetzt.
5. Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Biomolekülen nach Ansprüchen 3 und 4 dadurch gekenn- zeichnet, daß man die nach Immobilisierung noch vorhandenen restlichen aktiven Quadratsäuregruppen mit niedermolekularen Verbindungen, die mindestens eine primäre oder sekundäre Aminogruppe enthalten
- 45 müssen, deaktiviert.
6. Verfahren zur Herstellung von aktivierten Matrices nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, daß man eine polymere Matrix, die primäre oder sekundäre Aminogruppen enthalten, mit Quadratsäurediester, Quadratsäurehalogeniden oder Quadratsäureesterhalogeniden bei 0°C bis +100 °C umsetzt, bevorzugt sind +10 °C bis +60 °C.
- 50 7. Verfahren zur Herstellung von aktivierten Matrices nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung in einem üblichen organischen Lösungsmittel, daß sich während der Umsetzung nicht verändert, im molaren Unterschluß als auch im großen molaren Überschuß bezogen auf die Aminogruppen eingesetzt werden kann.
8. Verfahren zur Herstellung von aktivierten Matrices nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivierung in Gegenwart einer organischen Base, wie z. B. Triethylamin oder Pyridin ablaufen kann, und diese wird in einer Menge von 1 mol bis 100 mol, bevorzugt von 1 mol bis 10 mol bezogen auf 1 mol der Verbindung der allgemeinen Formel (I) eingesetzt.
- 55 9. Verfahren zur Herstellung von aktivierten Matrices nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionszeit in Abhängigkeit von den ausgewählten Reaktionskomponenten und der Reaktionstempla- tur schwankt, bevorzugt sind Zeiten zwischen 0.1 und 10 h.
- 60 10. Verfahren zur Herstellung von aktivierten Matrices nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, daß als polymere Matrix alle synthetischen als auch natürlichen Polymere geeignet sind, die kovalent primäre oder sekundäre Aminogruppen enthalten.
11. Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Biomolekülen nach Anspruch 4 dadurch gekennzeichnet, daß sich als Reaktionsmedium alle wässrigen Puffersysteme eignen, wie z. B. Phosphat, Citrat, Borat, Carbonat oder auch Gemische.
- 65 12. Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Biomolekülen nach Anspruch 4 dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentrationen der zu konjugierenden Moleküle in weiten Bereichen variieren kann und liegt z. B.

für zu koppelnde Proteine zwischen 0.01 und 50 mg/ml.

13. Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Biomolekülen nach Anspruch 4 dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung in einem Temperaturbereich von +4 °C bis +60 °C erfolgen kann.

14. Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Biomolekülen nach Anspruch 4 dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert während der Kopplungsreaktion zwischen 7 und 10 liegen kann.

15. Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Biomolekülen nach Anspruch 4 dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionszeit in Abhängigkeit von den ausgewählten Reaktionskomponenten, der Reaktionstemperatur und dem pH-Wert schwankt und liegt normalerweise bei 0.1 und 50 h.

16. Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Biomolekülen nach Anspruch 5 dadurch gekennzeichnet, daß sich als Abblockmedium sich alle wässrigen Puffersysteme eignen.

17. Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Biomolekülen nach Anspruch 5 dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der reaktiven Gruppen zum Abblocken in weiten Bereichen variieren kann und liegt z. B. für Aminosäuren zwischen 0.01 und 100 mg /ml.

18. Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Biomolekülen nach Anspruch 5 dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionstemperatur zum Abblocken in einem Temperaturbereich von +4 °C bis +60 °C liegt.

19. Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Biomolekülen nach Anspruch 5 dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert während der Abblockreaktion zwischen pH 7 und 10 liegen kann.

20. Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Biomolekülen nach Anspruch 5 dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionszeit in Abhängigkeit von den ausgewählten Abblock-Verbindungen, der Reaktionstemperatur und dem pH-Wert zwischen 0.1 und 50 h liegt.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

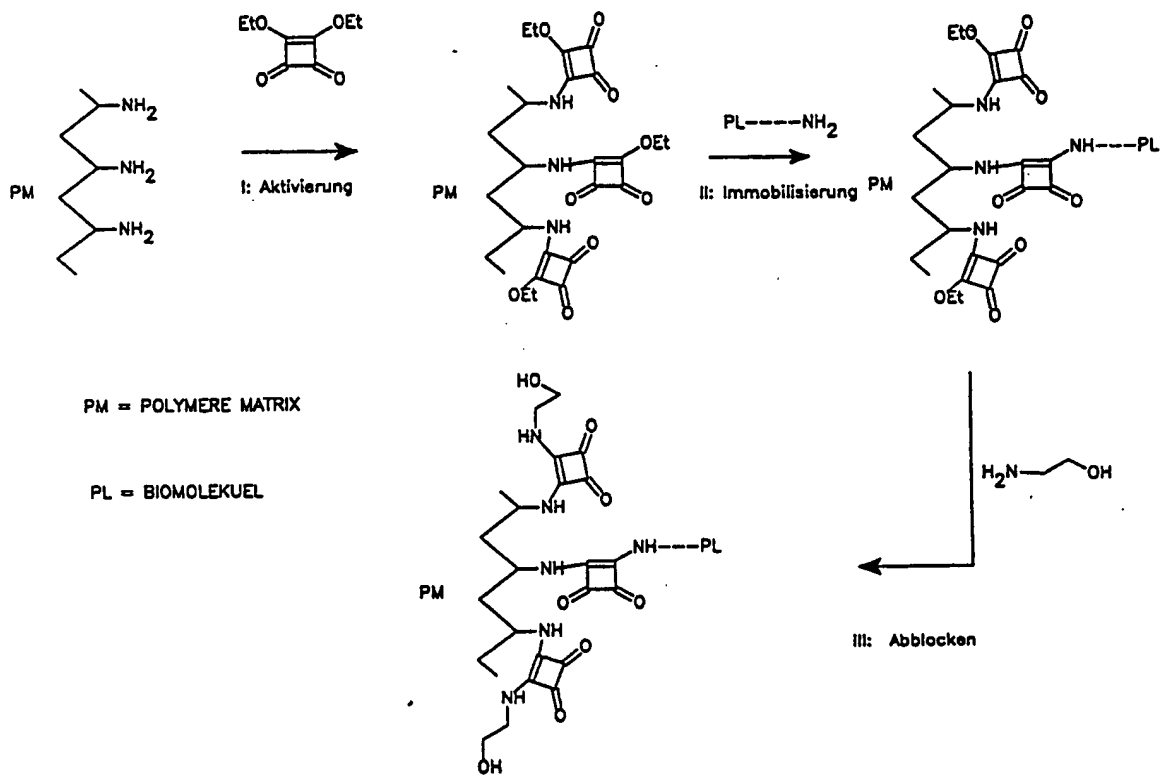


Abb. 1

DERWENT DE 4341524

1/1 WPIL - (C) Derwent- image

AN - 1995-216278 [29]

XA - C1995-100103

TI - Immobilised biomolecule, e.g., enzyme, antibody, cell or tissue section - is covalently bonded to polymer matrix via quadratic acid deriv.

DC - A96 B04 D16

PA - (EBER/) EBERLE-ADAMKIEWICZ G
 - (GLUE/) GLUESENKAMP K
 - (EBER/) EBERLE-ADAMKIEWICS G
 - (GLUS/) GLUSENKAMP K

IN - EBERLE-ADAMKIEWICZ G; GLUESENKAMP K; EBERLE-ADAMKIEWICS G; GLUSENKAMP K

NP - 5

NC - 4

PN - DE4341524 A1 19950608 DW1995-29 C12N-011/06 8p +
 AP: 1993DE-4341524 19931206
 - WO9515983 A1 19950615 DW1995-29 C07K-017/06 Ger 45p
 AP: 1994WO-DE01422 19941201
 DSNW: DE GB JP US

X - DE4341524 C2 19970116 DW1997-07 C12N-011/06 8p
 AP: 1993DE-4341524 19931206
 - DE4499550 T 19970724 DW1997-35 C07K-017/06
 FD: Based on WO9515983
 AP: 1994DE-4499550 19941201; 1994WO-DE01422 19941201
 - DE4499550 C1 19980903 DW1998-39 C07K-017/06
 FD: Based on WO9515983
 AP: 1994DE-4499550 19941201; 1994WO-DE01422 19941201

PR - 1993DE-4341524 19931206

CT - WO9012092
 03Jnl.Ref

IC - C07K-017/06 C12N-011/06 C07K-017/00 C07K-017/08 C07K-017/12
 C07K-017/14 C08B-037/16 C08F-008/00 C08G-069/48 C12N-011/08
 C12N-011/12 C12N-011/14 G01N-033/531

AB - DE4341524 A
 Immobilised biomolecules (I) have as the immobilising agent a quadratic acid deriv. which bonds covalent biomolecules to a polymer matrix.
 - USE - Use of (I), which includes immobilised enzymes, monoclonal and polyclonal antibodies, cells and cell parts, tissue sections and affinity ligands, is not disclosed.
 - ADVANTAGE - Compared with conventional immobilisations, the coupling to form (I) involves simple chemistry, giving a highly stable amide-like carrier-ligand bond and permitting the planned immobilisation of e.g., proteins. Also, a broad range of macromolecules, e., immunoglobulins and enzymes, can be stabilised against denaturing. (Dwg.0/1)

1C - CPI: A10-E01 A12-W11L B04-C02A B04-C02B1 B04-C03 B04-F01 B04-G01
 B04-G21 B04-G22 B04-L01 B04-N04 D05-A01B D05-H10

JP - 1995-29

JE - 1995-29; 1997-35; 1998-39